Review article

Morphological Characteristics and Molecular Markers in Identification of *Anopheles gambiae* Complex and *Anopheles stephensi* Members as Main Malaria Vectors in Africa and Asia

Zahra Asadi Saatlou[1, 2]
Navid Dinparast Djadid[3]
Saber Raeghi[4]
Naseh Maleki-Ravasan[3]
Saber Gholizadeh[5, 6*]

1- MSc Student in Medical Entomology and Vector Control, Cellular and Molecular Research Center, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran
2- MSc Student in Medical Entomology and Vector Control, Medical Entomology Department, School of Public Health, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran
3- Professor of Molecular Medical Entomology, Malaria and Vector Research Group, National Insectarium, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
4- Assistant Professor of Medical Parasitology, Department of Laboratory Sciences, Maragheh University of Medical Sciences, Maragheh, Iran
5- Associate Professor of Medical Entomology and Vector Control, Cellular and Molecular Research Center, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran
6- Associated Professor of Medical Entomology and Vector Control, Medical Entomology Department, School of Public Health, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

***Corresponding author:** Saber Gholizadeh, Medical Entomology Department, School of Public Health, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

Email: sabergholizadeh@yahoo.com, saber@umsu.ac.ir

Received: 26 June 2018
Accepted: 21 December 2018

ABSTRACT

Introduction and purpose: Human malaria is one of the widespread vector-borne diseases worldwide. Lots of efforts have been made to control and eliminate the vectors of the disease. *Anopheles gambiae* and *Anopheles stephensi* (*A. stephensi*) are the main vectors of malaria in Africa and Asia. The members of *Anopheles gambiae* complex contain the vector and non-vector species. *A. stephensi* has three biological forms with different vector capacities. The phenotypic and genotypic diversity has made it more difficult to identify vector populations and consequently the surveillance and control of malaria. The present study aimed to compare the morphological and molecular diagnostic characteristics of the two important malaria vectors in the two world continents.

Methods: After searching, studying, and organizing published papers related to the subject, *Anopheles gambiae* and *A. stephensi* species were compared based on the morphological and molecular characteristics. Different morphological keys for the two species, the specimens from the insectarium of Urmia University of Medical Sciences, as well as the present species of national insectarium in Pasteur Institute of Iran, were used for morphological comparison. In addition, all the present sequences of five molecular markers, including COI, COII, D3, ITS2, and OBP1, were extracted from GenBank and analyzed using bioinformatics software.

Results: Based on the obtained results of the present study, the number of ridges on *Anopheles gambiae* eggs was more than that on *A. stephensi* eggs. However, unlike *A. stephensi* in *Anopheles gambiae*, the number of ridges was not a diagnostic characteristic for the identification of *Anopheles gambiae* complex. There were four diagnostic characteristics in the larvae comparison of the two species and there were three different characteristics in adults. All the molecular markers were capable of separating the two species; however, ITS2 and D3, as well as COI, COII, and OBP1 markers were preferred for inter-species and intra-species comparisons, respectively.

Conclusion: The combination of traditional diagnostic and new molecular methods can be simultaneously used in inter-species separation. As a result, in order to eliminate malaria in Iran and the countries covered by The World Health Organization Regional Office for the Eastern Mediterranean, it is recommended that the combination of morphological, molecular, and field epidemiological data can provide practical solutions for vector control programs. Obviously, none of these data exclusively respond to the needs of the mentioned programs. Furthermore, the coordination, design, implementation, and evaluation of applied projects, as well as executive actions, are necessary for the success of these programs regarding the elimination and eradication of malaria and other vector-borne diseases.

Keywords: *Anopheles stephensi, Anopheles gambiae,* Morphological identification, Molecular taxonomy, Phylogenetics

▶ **Citation:** Asadi Saatlou Z, Dinparast Djadid N, Raeghi S, Maleki-Ravasan N, Gholizadeh S. Morphological Characteristics and Molecular Markers in Identification of *Anopheles gambiae* Complex and *Anopheles stephensi* Members as Main Malaria Vectors in Africa and Asia. Journal of Health Research in Community. Autumn 2018;4(3): 42-55.

[Downloaded from jhc.mazums.ac.ir on 2025-12-08]

[DOR: 20.1001.1.24236772.1397.4.3.5.4]

مقاله مروری

مروری بر ویژگی‌های مورفولوژیکی و مارکرهای مولکولی در شناسایی اعضای کمپلکس آنوفل گامبیه و آنوفل استفنسی ناقلین اصلی مالاریا در آسیا و آفریقا

زهرا اسدی ساعتلو[۱،۲]
نوید دین‌پرست جدید[۳]
صابر رائقی[۴]
ناصح ملکی رواسان[۳]
صابر قلی‌زاده[۵،۶*]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد حشره‌شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران
۲. دانشجوی کارشناسی ارشد حشره‌شناسی پزشکی، گروه حشره‌شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران
۳. استاد حشره‌شناسی پزشکی مولکولی، انستکاریوم ملی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۴. استادیار انگل‌شناسی پزشکی، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی مراغه، مراغه، ایران
۵. دانشیار، گروه حشره‌شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران
۶. دانشیار، گروه حشره‌شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایرا

* نویسنده مسئول: صابر قلی‌زاده، گروه حشره‌شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

Email: sabergholizadeh@yahoo.com, saber@umsu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۴/۰۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۹/۳۰

چکیده

مقدمه و هدف: مالاریای انسانی یکی از بیماری‌های منتقل‌شونده توسط حشرات است که انتشار وسیعی در سطح جهانی دارد. تلاش‌های بسیاری در جهت کنترل و حذف ناقلین این بیماری صورت گرفته است. *An. stephensi* و *An. gambiae* ناقلین اصلی این بیماری در دو قاره آسیا و آفریقا هستند. شایان ذکر است که اعضای کمپلکس گامبیه دارای گونه‌های ناقل و غیرناقل می‌باشد. آنوفل استفنسی نیز دارای سه فرم بیولوژیک است که از ظرفیت انتقال متفاوتی برخوردار هستند. این تنوع فنوتیپی و ژنوتیپی، شناسایی جمعیت‌های ناقل و به تبع آن پایش و کنترل بیماری مالاریا را دشوارتر نموده است. در این ارتباط، مطالعه حاضر با هدف مقایسه ویژگی‌های تشخیصی مورفولوژیکی و مولکولی در دو گونه مهم ناقل مالاریا در دو قاره جهان (آسیا و آفریقا) انجام شد.

روش کار: پس از جستجو، مطالعه و دسته‌بندی مقالات مرتبط با موضوع مورد بحث، مقایسه دو گونه *An. gambiae* و *An. stephensi* براساس ویژگی‌های مورفولوژیک و مولکولی انجام شد. برای مقایسه مورفولوژیکی از کلیدهای مورفولوژیک جداگانه معرفی‌شده برای دو گونه، نمونه‌های موجود در انستکاریوم دانشگاه علوم پزشکی ارومیه و نمونه‌های موجود در انستکاریوم ملی انستیتو پاستور ایران استفاده گردید. برای مقایسه مولکولی دو گونه نیز تمامی توالی‌های موجود از پنج مارکر مولکولی *COII* (Cytochrome c Oxidase II)، *COI* (Cytochrome c Oxidase I)، *D3* (Domain 3)، *ITS2* (Internal Transcribed Spacer2) و *OBP1* (Odorant-binding Proteins) در بانک جهانی ژن استخراج شدند و با استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیک آنالیز گردیدند.

یافته‌ها: نتایج نشان دادند که تعداد ریچ‌های روی تخم *An. gambiae* از *An. stephensi* بیشتر می‌باشند؛ اما بر خلاف *An. stephensi*، تعداد ریچ‌ها در *An. gambiae* صفت تشخیصی برای جداسازی کمپلکس آن محسوب نمی‌شوند. در مقایسه لاروهای دو گونه، چهار ویژگی و در بالغین، سه ویژگی متفاوت وجود داشت. علاوه‌براین، تمامی مارکرهای مولکولی به‌خوبی توانستند دو گونه را از یکدیگر تفکیک کنند؛ اما مارکرهای *ITS2* و *D3* برای مقایسه‌های بین گونه‌ای و *COI*، *COII* و *OBP1* برای مقایسه‌های درون گونه‌ای ارجح‌تر می‌باشند.

نتیجه‌گیری: استفاده تلفیقی از روش‌های تشخیصی سنتی و روش‌های مولکولی جدید می‌توانند همزمان در تفکیک بین گونه‌ای استفاده شوند؛ از این رو در راستای برنامه حذف مالاریا در ایران و کشورهای تحت پوشش دفتر منطقه‌ای مدیترانه شرقی سازمان جهانی بهداشت توصیه می‌گردد با استفاده از تلفیق داده‌های مورفولوژیکی، مولکولی و اپیدمیولوژی میدانی، راه‌کارهایی عملی را برای برنامه‌های کنترل ناقلین ارائه داد. بدیهی است که هیچ‌کدام از این داده‌ها به‌تنهایی پاسخگوی نیازهای برنامه کنترل ناقلین نبوده و هماهنگی طراحی، اجرا و ارزیابی طرح‌های تحقیقاتی کاربردی و اقدامات اجرایی برای موفقیت حذف و ریشه‌کنی مالاریا و دیگر بیماری‌های ناقل‌زاد مورد نیاز می‌باشد.

کلمات کلیدی: آنوفل استفنسی، آنوفل گامبیه، تاکزونومی مولکولی، تشخیص مورفولوژیک، فیلوژنتیک

◀ **استناد:** اسدی ساعتلو، زهرا؛ دین‌پرست جدید، نوید؛ رائقی، صابر؛ ملکی رواسان، ناصح؛ قلی‌زاده، صابر. مروری بر ویژگی‌های مورفولوژیکی و مارکرهای مولکولی در شناسایی اعضای کمپلکس آنوفل گامبیه و آنوفل استفنسی ناقلین اصلی مالاریا در آسیا و آفریقا. مجله تحقیقات سلامت در جامعه، پاییز ۱۳۹۷؛۴(۳): ۵۵-۴۲.

مقدمه

مالاریا یکی از شاخص‌ترین بیماری‌های انگلی بوده و دارای قدمتی طولانی می‌باشد [۱]. این بیماری توسط تک‌یاخته

[Downloaded from jhc.mazums.ac.ir on 2025-12-08]
[DOR: 20.1001.1.24236772.1397.4.3.5.4]

بیماری‌زایی از جنس پلاسمودیوم ایجاد شده و توسط پشه آنوفل ماده منتقل می‌گردد. براساس گزارش سازمان جهانی بهداشت (WHO: World Health Organization) در سال ۲۰۱۶، بروز مالاریا نسبت به سال ۲۰۰۰ به میزان ۴۱ درصد کاهش داشته و در ۱۷ کشور این بیماری حذف شده است؛ اما هنوز چالش‌های مهمی وجود دارند [۲،۳]. از سوی دیگر، در جنگ‌های بیولوژیکی از مالاریا به‌عنوان یک بیماری تأثیرگذار و از ناقل آن به‌عنوان یک پتانسیل قوی در انتقال عوامل عفونی یاد می‌گردد؛ از این رو مالاریا بیش از هر بیماری دیگری روند و نتیجه جنگ را تحت تأثیر قرار داده و به‌عنوان یک ابزار بیولوژیکی در جنگ‌ها مطرح می‌باشد [۴]. بر این اساس با مشارکت کارکنان ارتش، ایالات متحده در کنترل بیماری مالاریا به نتایج علمی و پیشرفت‌های پزشکی دست یافته است که کمک شایان توجهی در راستای دست‌یافتن به داروهای مؤثر ضد مالاریا و واکسن برای پیشگیری از ابتلا به این بیماری نموده است [۵]. برای محافظت نیروهای نظامی از این بیماری جدی و کشنده می‌توان از پیشگیری دارویی، محافظت فردی و کنترل ناقلین بیماری استفاده کرد.

از نظر تاکسونومی ناقلین مالاریا از سلسله جانوران، شاخه بندپایان، رده حشرات، راسته دوبالان و خانواده کولیسیده هستند. این خانواده دارای دو زیرگروه Culicinae و Anophelinae می‌باشد که شامل ۱۱۳ جنس است. ناقلین بیماری مالاریا در زیرگروه Anophelinae قرار دارند و تاکنون ۴۸۸ گونه آنوفل در دنیا شناخته شده است که حدوداً ۴۰ تا ۷۰ گونه از آن‌ها می‌توانند ناقل بیماری مالاریا باشند [۶،۷]. بر این اساس، شناسایی زیرگروه Anophelinae به‌عنوان ناقلین اصلی مالاریا در سراسر جهان از اهمیت بیشتری برخوردار است [۸].

این زیرگروه شامل سه جنس *Anopheles*، *Chagasia* و *Bironella* می‌باشد که جنس *Anopheles* آن دارای هشت زیرجنس Baimaia، Stetomyia، Lophopodomyia، Nysorrhynchus، Kertezia، Cellia، Anopheles و Christya است. دو زیرجنس Anopheles و Cellia در دنیای قدیم وجود دارند و به‌ترتیب شامل ۲۲۴ و ۱۸۵ گونه آنوفل هستند [۹]. دو گونه آنوفل ناقل مالاریا در آسیا و آفریقا یعنی *An. gambiae* و *An. stephensi* در زیرجنس Cellia دسته‌بندی شده‌اند. لازم به ذکر است که از نظر طبقه‌بندی با وجود اینکه هر دو گونه در زیرجنس Cellia جای دارند؛ اما از نظر سطوح تاکسونومیکی پایین‌تر دارای تفاوت‌هایی می‌باشند.

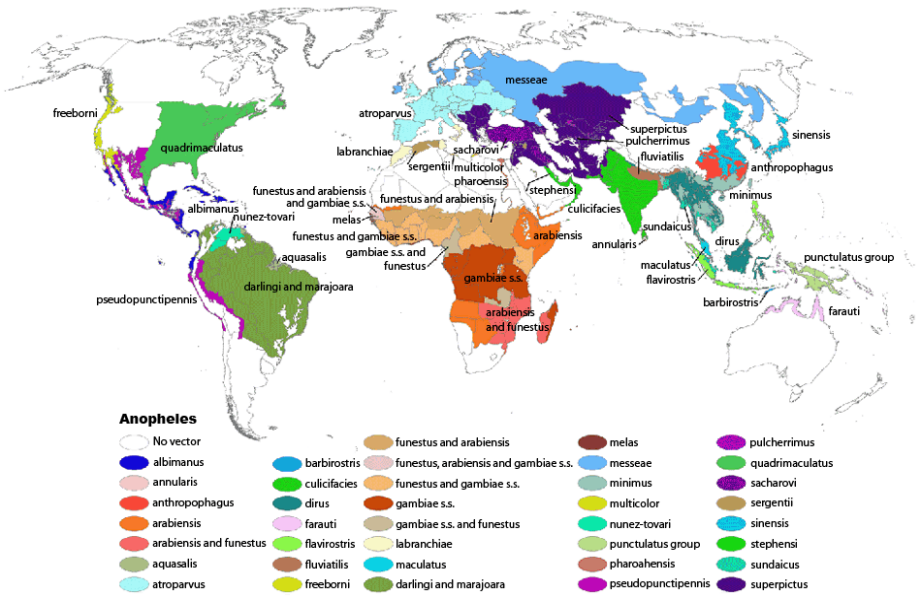
An. gambiae یکی از ناقلین مهم مالاریا در نواحی مرکزی تا جنوب قاره آفریقا در کشورهایی همچون سودان، تانزانیا، جمهوری دموکراتیک کنگو، کنیا، بنین، سنگال، آنگولا، زیمبابوه، یمن و شبه جزیره عربستان بوده و دارای شش گونه (Sibling) می‌باشد (شکل ۱) [۱۳-۱۰].

همان‌طور که مشاهده می‌شود، *An. gambiae* در قسمت‌های غرب و جنوب شرقی قاره آفریقا، *An. arabiensis* در غرب، شرق و جنوب شرقی قاره آفریقا، *An. quadriannulatus* و *An. bwabae* در شرق و جنوب شرقی و *An. melas* و *An. merus* در غرب و جنوب شرقی قاره آفریقا پراکنده هستند [۱۰]. *An. gambiae* و *An. arabiensis* نسبت به سایرین ظرفیت انتقال بیشتری دارند [۱۰،۱۱]. *An. gambiae* در اماکن داخلی یا محیط خارجی خون‌خواری نموده و استراحت می‌کند و لاروهای آن توانایی زندگی در آب‌های شور را دارند [۱۵،۱۶].

An. stephensi یکی از ناقلین مهم مالاریا است که در تایلند، مالزی، اتیوپی، بنگلادش، میانمار، نپال، شبه قاره هند، پاکستان، افغانستان، ایران و جنوب شرقی عربستان سعودی پراکنده می‌باشد (شکل ۱) [۲۲-۱۷]. این ناقل دارای سه فرم بیولوژیک *An. stephensi intermediate*، *An. stephensi mysorensis* و *An. stephensi* type می‌باشد [۲۵-۲۳] که *An. stephensi* در انواع آب‌ها از جمله آب‌های سطحی، کم‌عمق و آبشارها تخم‌گذاری کرده و در محیط خارجی بر روی انسان و یا حیوانات خون‌خواری می‌کند و در اماکن داخلی استراحت می‌نماید [۱۹].

[Downloaded from jhc.mazums.ac.ir on 2025-12-08]

[DOR: 20.1001.1.24236772.1397.4.3.5.4]



شکل ۱: توزیع جهانی ناقلین مالاریا [۱۴]

ذکر این نکته ضرورت دارد که فرم *An. stephensi* type در نواحی شهری، *An. stephensi intermediat* در نواحی شهری و نیمه‌شهری و *An. stephensi mysorensis* در نواحی روستایی پراکنده می‌باشند [۲۸-۲۶].

یکی از مهم‌ترین اقدامات برای کنترل مالاریا، مبارزه با پشه‌های آنوفل است که در کوتاه‌ترین زمان ممکن، بیشترین عواید را به بیشترین افراد در یک جامعه ارائه می‌کند. مطابق با استراتژی ملی کنترل مالاریا، کنترل ناقلین به‌عنوان اصلی‌ترین راه برای کاهش انتقال مالاریا در سطح جامعه پس از درمان دارویی افراد مبتلا در اولویت دوم قرار می‌گیرد. کنترل پشه‌های ناقل شامل مراحل بالغ و نابالغ آن‌ها می‌شود. یکی از مهم‌ترین زمینه‌های کاری در این اقدام، شناسایی دقیق ناقلین با استفاده از روش‌های مورفولوژیکی سنتی و روش‌های ژنتیکی جدید است. با توجه به اهمیتی که این دو ناقل در دو قاره آسیا و آفریقا دارند و به‌عنوان ناقلین اصلی مالاریا در دو قاره محسوب می‌شوند و نیز اینکه هر دو از زیرجنس Cellia می‌باشند، در این مطالعه ویژگی‌های مورفولوژیکی و مولکولی این دو ناقل با یکدیگر مقایسه شده و صفات مورد استفاده برای شناسایی آن‌ها تفکیک گردیده است.

روش کار

در این مطالعه برای مقایسه این دو گونه (*An. gambiae* و *An. stephensi*) ابتدا مقالاتی از پایگاه‌های اطلاعاتی Science Direct، PubMed، Scopus، Google Scholar و Proquest جمع‌آوری شدند. برای استفاده از منابع فارسی نیز از داده‌های اطلاعاتی پایگاه‌های Iranmedex، Magiran، SID و Irandoc از سال ۲۰۰۶ تا ۲۰۱۷ استفاده گردید. شایان ذکر است که برای جستجوی این مقالات از کلماتی همچون *An. gambiae*، *An. stephensi*، *Morphological Keys*، Molecular Identification،

[Downloaded from jhc.mazums.ac.ir on 2025-12-08]

[DOR: 20.1001.1.24236772.1397.4.3.5.4]

Molecular Markers، Distribution، Molecular، Keys و Identification استفاده شد. مقالات جمع‌آوری‌شده ابتدا براساس نام گونه، سپس بر مبنای نوع مقایسه مورفولوژیکی یا مولکولی و در ادامه براساس موضوعاتی چون مراحل زندگی و نوع مارکرهای مربوط به شناسایی مولکولی گونه‌ها دسته‌بندی شدند.

به‌منظور انجام این پژوهش ابتدا براساس مراحل زندگی، مطالعه مورفولوژیک دو گونه در مراحل تخم، لارو و بالغ انجام شد و مقالات و کلیدهای تشخیصی موجود برای هر گونه استخراج گردید، دسته‌بندی شد و به‌صورت مقایسه‌ای مورد مطالعه قرار گرفت. باید خاطرنشان ساخت که در کلیدهای موفولوژیک، برخی از ویژگی‌ها وجود داشتند که در کلید هر دو گونه به آن‌ها اشاره شده بود؛ اما برخی از ویژگی‌های کلیدی *An. gambiae* در کلید تشخیصی *An. stephensi* کاربرد نداشتند؛ از این رو برای بررسی و مقایسه از نمونه‌های موجود در موزه دانشکده بهداشت، انسکتاریوم دانشگاه علوم پزشکی ارومیه و همچنین نمونه‌های موجود در انسکتاریوم ملی بخش مطالعات مالاریا و ناقلین انستیتو پاستور ایران استفاده شد.

در این مطالعه در مرحله تخم یک ویژگی، در مرحله لاروی نه ویژگی و در مرحله بالغ هفت ویژگی مورد بررسی قرار گرفت. علاوه‌براین برای مقایسه مولکولی، توالی ژن‌های موجود از هر مارکر مولکولی از بانک جهانی ژن جمع‌آوری گردید. برای این کار از کلمات کلیدی *COI* (Cytochrome c Oxidase I)، *COII* (Cytochrome c Oxidase II)، *ITS2* (Internal Transcribed Spacer2)، *D3* (Domain 3) و *OBP1* (Odorant-binding Proteins) استفاده شد. لازم به ذکر است که در مطالعه حاضر از پنج مارکر مولکولی برای مقایسه این دو گونه آنوفل استفاده گردید که رایج‌ترین آن‌ها عبارت بودند از: *ITS2*، *COI*، *COII*، *D3* و *OBP1*. برای یکسان‌سازی سکانس و توالی‌ها نیز از نرم‌افزار آنلاین MultAlin و Bioedite استفاده شد. همچنین، به‌منظور آنالیزهای فیلوژنتیکی از نرم‌افزار MEGA7 بهره گرفته شد.

یافته‌ها

پایه شناسایی موفولوژیکی گونه‌ها براساس ویژگی‌های ظاهری موجود در مراحل زندگی می‌باشد. شباهت‌ها و تفاوت‌های ظاهری براساس مطالعات مورفولوژیکی در جدول ۱ نشان داده شده است. مقایسه مورفولوژی تخم نشان می‌دهد که تفاوت مهم در تخم‌های این دو گونه تنها براساس تعداد ریچ‌های موجود بر روی تخم بوده و در *An. gambiae* بیشتر از *An. stephensi* است. بر خلاف *An. stephensi*، مورفولوژی تخم صفت تشخیصی برای تفکیک کمپلکس *An. gambiae* محسوب نمی‌شود. مهم‌ترین ویژگی‌ها در تشخیص لاروهای دو گونه از یکدیگر، ابریشمهای جانبی مزوتوراکس، پایه ابریشم‌های جانبی و پایه ابریشم نشانه پروتوراکس (P-1) می‌باشند (شکل ۲).

ویژگی کلیدی در تشخیص مرحله بالغ *An. stephensi* وجود لکه‌های روشن بر روی ران و ساق پا است که این ویژگی در An. *gambiae* نیز مشاهده می‌شود. در مطالعه حاضر برای بالغین این دو گونه، وجود یا عدم وجود لکه روشن منقطع در سومین ناحیه تیره رگبال جلویی مشاهده گردید (شکل ۳).

بر مبنای نتایج، سایز توالی کامل *ITS2* در *An. gambiae* معادل ۴۳۲-۴۳۱ bp و در *An. stephensi* برابر با ۴۶۸-۴۶۶ bp می‌باشد. بر این اساس با درنظرگرفتن این اختلاف سایز می‌توان این ناقلین را از یکدیگر جدا کرد. اختلاف مشاهده‌شده در توالی‌های *ITS2*، *An. gambiae* و *An. stephensi* در جدول ۲ نشان داده شده است. درخت فیلوژنی رسم‌شده از توالی‌های *An. gambiae* و *An. stephensi* بر پایه مارکر *ITS2* نیز در شکل ۴ قابل مشاهده می‌باشد. براساس این مارکر، دو گونه به همراه کمپلکس *An. gambiae* به‌صورت جداگانه دسته‌بندی

[Downloaded from jhc.mazums.ac.ir on 2025-12-08]

[DOR: 20.1001.1.24236772.1397.4.3.5.4]

جدول ۱: مقایسه مورفولوژیکی گونه‌های *An. gambiae* و *An. stephensi* در مراحل مختلف زندگی

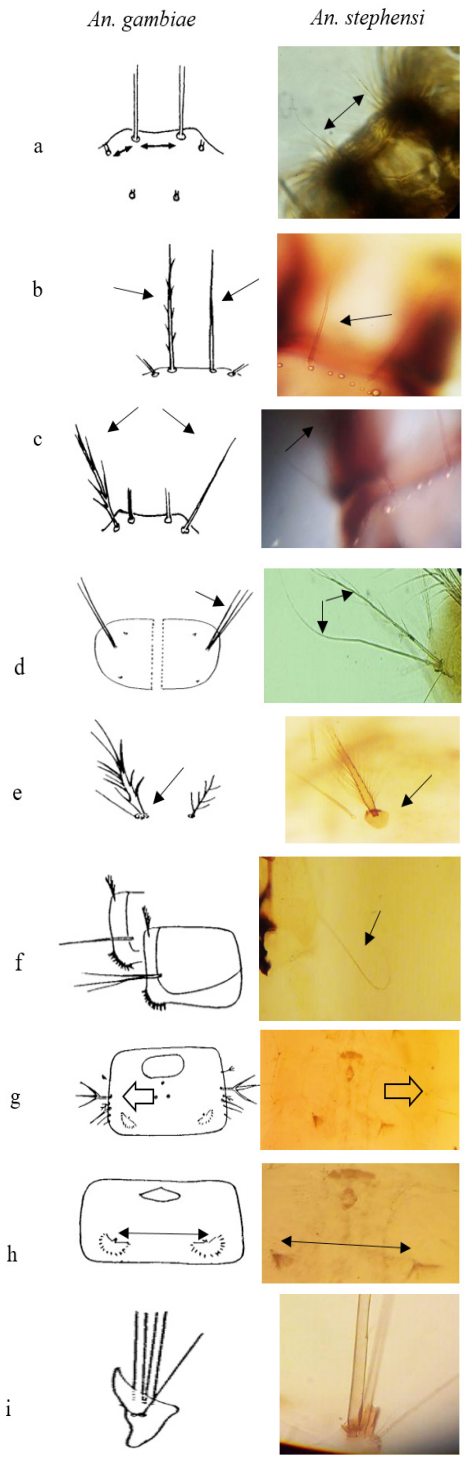
مرحله	*An. gambiae*	*An. stephensi*
تخم (ریج‌های روی تخم)	۳۰-۲۵	۲۲-۹
لارو	a کلیپتال‌های داخلی از یکدیگر فاصه دارند.	کلیپتال‌های داخلی از یکدیگر فاصله دارند.
	b کلیپتال‌های داخلی یا ساده هستند و یا انشعاب جزئی آن‌ها محدود به نصف کلیپتال می‌باشد.	کلیپتال‌های داخلی ساده است.
	c کلیپتال‌های خارجی یا ساده هستند و یا کمتر از هشت انشعاب دارند.	ساده بوده و گاهی اوقات کمی در قسمت نوک منشعب شده‌اند.
	d ابریشم‌های جانبی مزوتوراکس 9M و 10M هر دو ساده هستند.	9M منشعب بوده و 10M ساده می‌باشد.
	e ابریشم نشانه پروتوراکس 1-P به‌طور ناچیزی رشد کرده و پایه توبرکل آن یا بسیار کوچک بوده و یا موجود نمی‌باشد.	پایه توبرکل این ابریشم به‌خوبی اسکلروتیزه شده است.
	f موی Saddle یا موی دمی ساده دارای ۴-۲ انشعاب می‌باشد.	موی Saddle ساده است.
	g اطراف بندهای شکمی و قفسه سینه فاقد Spicules یا خار است.	اطراف بندهای شکمی و قفسه سینه فاقد Spicules یا خار است.
	h پهنای ترگال پلیت شکمی حدود ۲/۳ فاصله بین ابریشم‌های پنجه‌ای می‌باشد.	پهنای آن بیشتر از نصف فاصله بین ابریشم‌های پنجه‌ای نمی‌باشد.
	i پایه ابریشم‌های جانبی ۱۲-۹ بزرگ، نوک‌تیز و خمیده است.	کوچک و گرد می‌باشد.
بالغ	a رگبال جلویی بال حداقل چهار لکه تیره یا روشن دارد.	رگبال جلویی بال حداقل چهار لکه تیره یا روشن دارد.
	b پاها دارای لکه‌های روشن هستند.	پاها دارای لکه‌های روشن هستند.
	c بندهای هفت و هشت شکمی تنها دارای فلس‌های روشن می‌باشند.	بندهای ۸-۲ شکمی پوشیده از فلس‌های روشن می‌باشند.
	d پالپ‌ها دارای سه یا چهار باند روشن هستند	پالپ‌ها با چهار باند روشن هستند که باند انتهایی نوک آن‌ها واضح‌تر می‌باشد.
	e سومین ناحیه تیره رگبال دارای یک لکه منقطع تیره می‌باشد.	سومین ناحیه تیره رگبال فاقد آن لکه روشن است.
	f بندهای ۴-۱ پنجه‌های پا در انتهای هر بند دارای لکه روشن هستند.	بندهای ۴-۱ پنجه‌های پا در انتهای هر بند دارای لکه روشن است.
	f در فرانژهای منتهی به رگبال‌ها، لکه‌های روشن وجود دارد.	در فرانژهای منتهی رگبال‌ها لکه‌های روشن وجود دارد.

می‌شوند. گونه‌هایی مانند *An. arabiensis* و *An. bwambae* نیز در شاخه‌ای جدا از *An. gambiae* قرار می‌گیرند. باید توجه داشت که مارکر *ITS2* نتوانسته است فرم‌های بیولوژیک *An. stephensi* را از یکدیگر تفکیک نماید. ذکر این نکته ضرورت دارد که یک توالی از *An. stephensi* (به شماره HQ703001) که با *An. stephensi* حدود ۱۴-۱۳ درصد اختلاف را نشان می‌داد، در درخت فیلوژنی در شاخه‌ای جداگانه از توالی‌های *An. stephensi* قرار گرفت.

در درخت فیلوژنی رسم‌شده براساس توالی‌های *COI* در *An. gambiae* و *An. stephensi*، دو گونه در دو شاخه جداگانه قرار گرفتند. علاوه‌براین، *An. stephensi* در سه زیرشاخه مجزا جای گرفت. باید خاطرنشان ساخت که تفکیک گونه‌ها در *An. gambiae* به‌خوبی صورت نگرفته است؛ برای مثال دو توالی از *An. bwambae* به‌صورت جدا از یکدیگر

[Downloaded from jhc.mazums.ac.ir on 2025-12-08]

[DOR: 20.1001.1.24236772.1397.4.3.5.4]



شکل ۲: مقایسه ویژگی‌های مورفولوژیکی مرحله لاروی *An. gambiae* و *An. stephensi*

***حروف a تا i منطبق بر ویژگی‌های ارائه‌شده در جدول ۱ می‌باشند.**

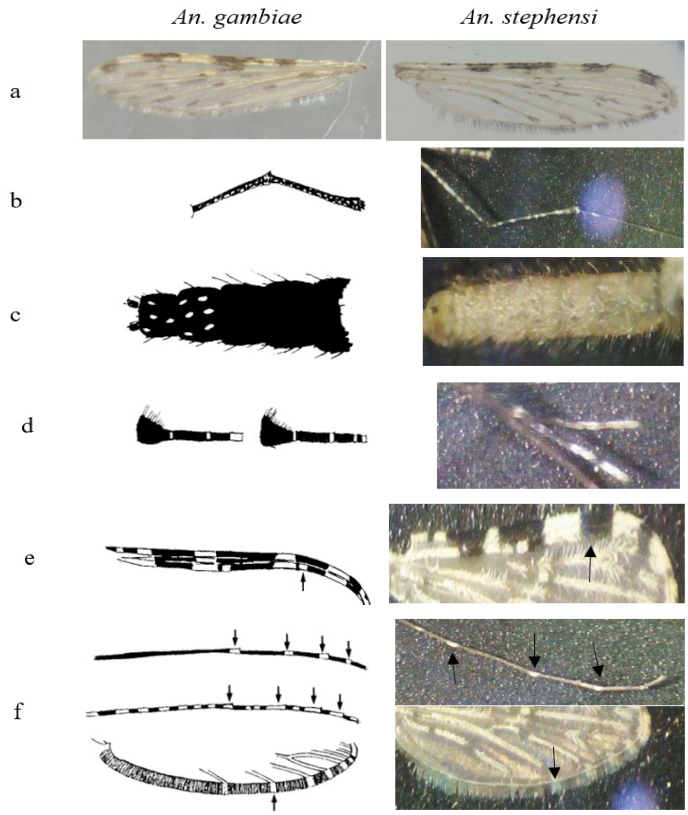
بوده و توالی‌های *An. arabiensis* در میان توالی‌های *An. gambiae* قرار گرفته‌اند. تفاوت‌های بین و داخل گونه‌ای براساس مارکرهای مولکولی مورد مطالعه در جدول ۲ نشان داده شده است.

درخت فیلوژنی رسم‌شده از توالی‌های دو گونه براساس *COII* نشان داد که این مارکر می‌تواند دو گونه را به‌خوبی از یکدیگر جدا کند و توالی‌های *An. stephensi* را در سه گروه مجزا دسته‌بندی نماید (شکل ۵). در این مرحله در مجموع، ۸۳ توالی از بانک جهانی ژن تحت عنوان *An. gambiae D3* و *An. stephensi* استخراج شد که سه توالی آن به دلیل سایز کوچک مورد استفاده قرار نگرفت. لازم به ذکر است که از اعضای کمپلکس *An. gambiae* تنها توالی مربوط به *An. gambiae* و *An. arabiensis* در بانک جهانی ژن ثبت شده بود. باید عنوان نمود که نمونه‌های *An. gambiae* از آنگولا در قاره آفریقا و نمونه‌های *An. stephensi* از شبه قاره هند و چین جمع‌آوری گردیدند. مقایسه توالی‌ها نشان داد که بین توالی‌های *An. gambiae* حدود ۰/۲۶-۰ درصد، بین توالی‌های *An. stephensi* حدود ۱/۵۳-۰ درصد و بین توالی‌های دو گونه با یکدیگر به‌طور میانگین ۱۷ درصد اختلاف وجود دارد. از سوی دیگر، در این مطالعه سایز توالی‌ها در *An.gambiae* معادل ۳۸۳ bp و در *An. stephensi* معادل ۳۹۴-۳۹۲ bp به‌دست آمد.

درخت فیلوژنی که با استفاده از توالی *D3* در *An. gambiae* و *An. stephensi* رسم شد، نشان داد که این مارکر می‌تواند دو گونه را به‌خوبی از یکدیگر مجزا کند و در دو شاخه جداگانه قرار دهد؛ اما نمی‌تواند اعضای درون گونه را تفکیک نماید (شکل ۶). از سوی دیگر، درخت فیلوژنی دیگری براساس توالی اینترون ناحیه *OBP1* رسم گردید که علاوه بر جداسازی دو گونه از یکدیگر، *An. stephensi* را در سه گروه مجزا قرار داد (شکل ۷).

[Downloaded from jhc.mazums.ac.ir on 2025-12-08]

[DOR: 20.1001.1.24236772.1397.4.3.5.4]



شکل ۳: مقایسه ویژگی‌های مورفولوژیکی بالغ *An. stephensi* و *An. gambiae*

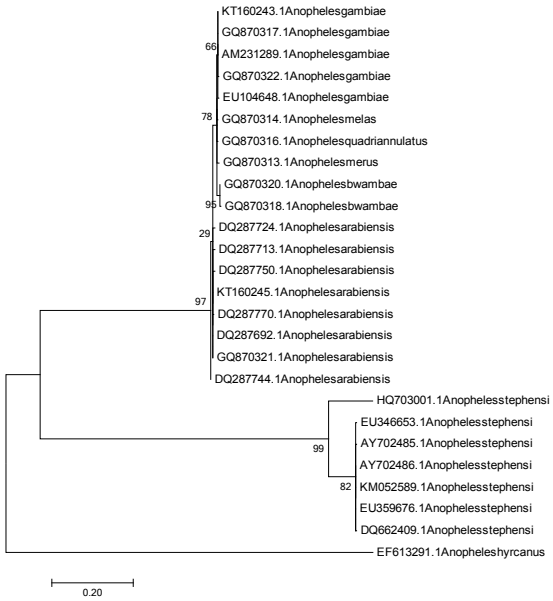
***حروف a تا f منطبق بر ویژگی‌های ارائه‌شده در جدول ۱ می‌باشند.**

جدول ۲: تفاوت‌های ژنتیکی گونه‌های *An. gambiae* و *An. stephensi* براساس مارکرهای مولکولی مختلف

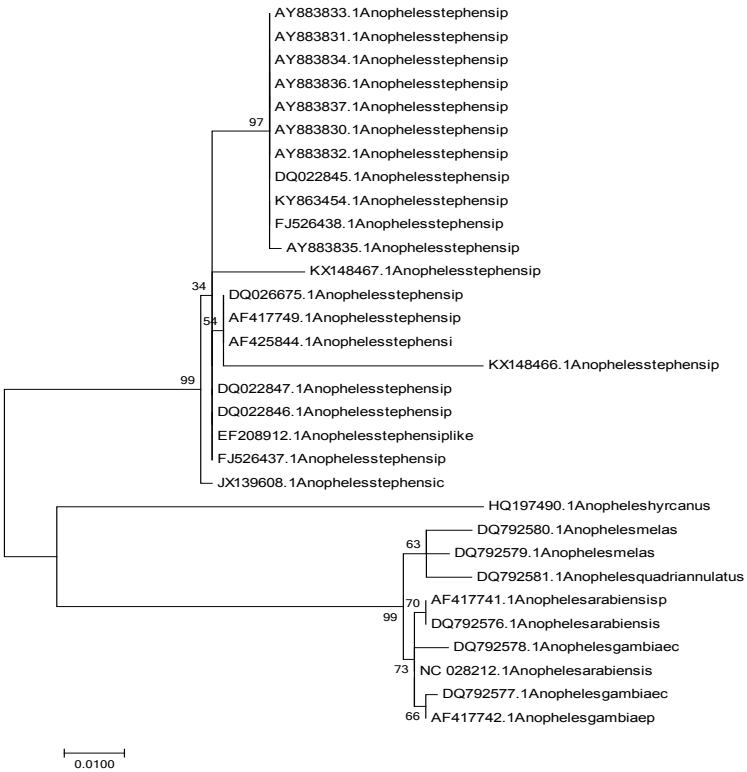
مارکر مولکولی		اختلاف داخل گونه (درصد)	تعداد توالی‌های مورد بررسی	اختلاف بین دو گونه (درصد)	Insertion	Deletion	Transition	Transversion
ITS2	*An. gambiae*	۰/۳-۰۲	۲۹۶	۴۷/۳۳	۰	۱	۴۵	۱۶
	An. stephensi	۳-۰			۴	۱	۸	۸
COI	*An. gambiae*	۰/۰-۰۹/۶۴	۱۵۹	۱۱/۵	۰	۱	۳۴	۱۱
	An. stephensi	۲-۰/۰۵			۰	۰	۱۶	۱
COII	*An. gambiae*	۰/۱۶-۱/۶۶	۳۰	۱۱/۳	۰	۰	۱۷	۳
	An. stephensi	۶-۰/۹۴			۶	۱۱	۲۶	۱۹
D3	*An. gambiae*	۰-۰/۲۶	۸۰	۱۷	۰	۰	۰	۱
	An. stephensi	۰/۱-۵۳			۰	۲	۳	۳
OBP1	*An. gambiae*	-	۴۶		-	-	-	-
	An. stephensi	۰/۲-۶۲			۰	۱۹	۵	۲۴

[Downloaded from jhc.mazums.ac.ir on 2025-12-08]

[DOR: 20.1001.1.24236772.1397.4.3.5.4]



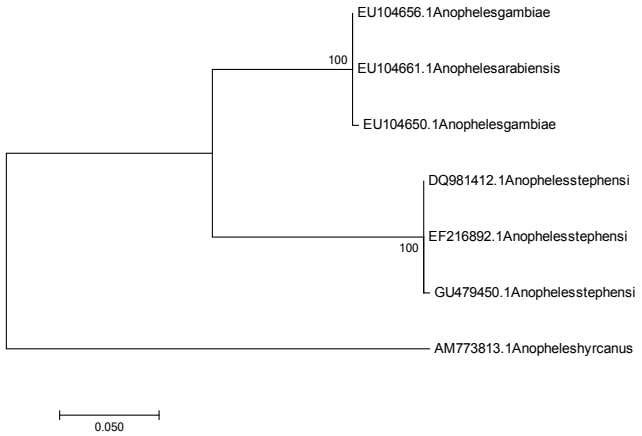
شکل ۴: درخت فیلوژنتیک آنوفل استفنسی و آنوفل گامبیه از مطالعات مختلف انجام‌شده براساس توالی *ITS2* با مدل Kimura2-parameter بر پایه Maximum Likelihood



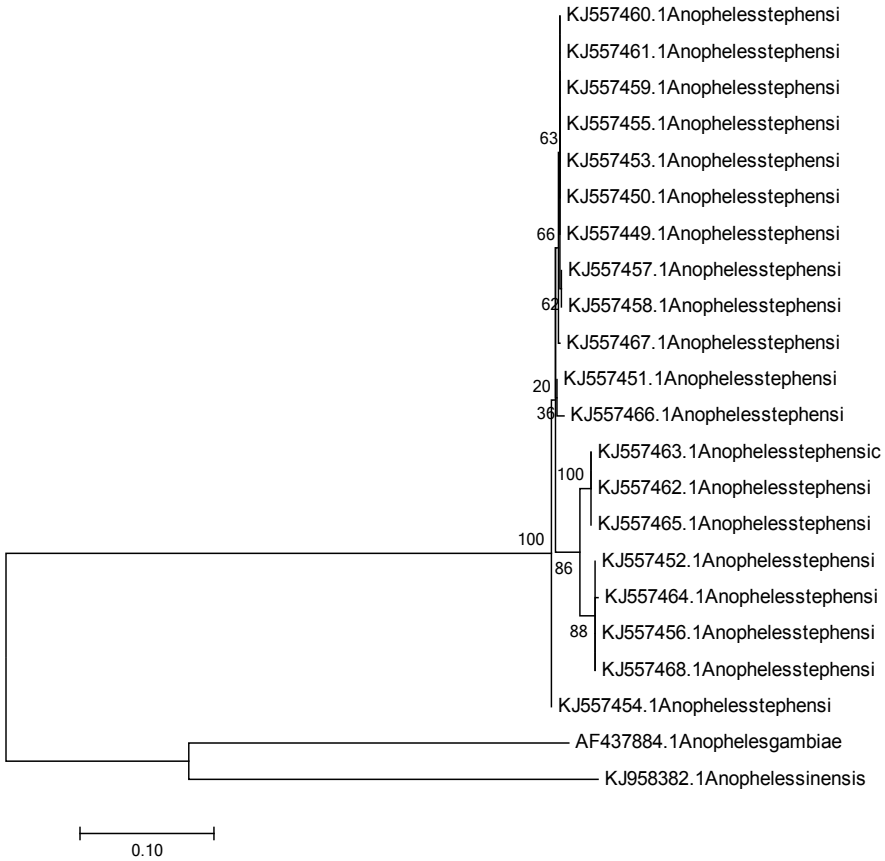
شکل ۵: درخت فیلوژنتیک آنوفل استفنسی و آنوفل گامبیه از مطالعات مختلف انجام‌شده براساس ژن *COII* با مدل Kimura2-parameter بر پایه Maximum Likelihood

[Downloaded from jhc.mazums.ac.ir on 2025-12-08]

[DOR: 20.1001.1.24236772.1397.4.3.5.4]



شکل ۶: درخت فیلوژنتیک آنوفل استفنسی و آنوفل گامبیه از مطالعات مختلف انجام‌شده براساس ژن *D3* با مدل Kimura2-parameter بر پایه Maximum Likelihood



شکل ۷: درخت فیلوژنتیک آنوفل استفنسی و آنوفل گامبیه از مطالعات مختلف انجام‌شده براساس ژن *OBP1* با مدل Kimura2-parameter بر پایه Maximum Likelihood

[Downloaded from jhc.mazums.ac.ir on 2025-12-08]

[DOR: 20.1001.1.24236772.1397.4.3.5.4]

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعات حشره‌شناسی استفاده از روش‌های مورفولوژیکی مرسوم می‌باشد. در پژوهش حاضر سه مرحله زندگی این حشره در اختلافات بین گونه‌ای آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه مورفولوژی تخم نشان می‌دهد که مورفولوژی تخم، صفت تشخیصی برای تفکیک کمپلکس *An. gambiae* محسوب نمی‌شود. مطالعات بسیار محدودی در ارتباط با مورفولوژی تخم هر دو آنوفل انجام شده است. بر مبنای مطالعات، قسمت جلویی تخم *An. gambiae* عریض‌تر از قسمت پشتی بوده و تعداد ریج‌های روی تخم ۳۰-۲۵ عدد گزارش شده است [۲۹]. از سوی دیگر، *An. stephensi* براساس ریج‌های روی تخم به سه فرم تقسیم‌بندی می‌شود که تعداد ریج‌های موجود در فرم type حدود ۲۲-۱۶ مورد، تعداد ریج‌ها در فرم intermediate حدود ۱۲-۷ مورد و در فرم mysorensis بین ۱۵-۹ مورد گزارش شده است [۲۸]. به نظر می‌رسد استفاده از ویژگی‌های مورفولوژیک در مراحل لاروی و بالغ دو گونه در تفکیک آن‌ها کاملاً کاربردی می‌باشد.

استفاده از مارکرهای ژنتیکی در تفکیک ناقلین مالاریا از اهمیت بالایی برخوردار است. استفاده از سموم، جهش ژنتیکی و مهاجرت ژنی می‌تواند تأثیر مستقیمی بر شناسایی نمونه داشته باشد. با توجه به ماهیت ژن‌های هسته‌ای و میتوکندریایی، استفاده از هرکدام از آن‌ها در تشخیص (با توجه به اهداف مطالعه) اهمیت دارد. شایان ذکر است که مقایسه همزمان دو گونه *An. stephensi* و *An. gambiae* تاکنون انجام نشده و از این مارکر تنها برای شناسایی و مطالعه ژنتیک جمعیت یکی از این دو گونه استفاده گردیده است. مارکر *ITS2* یکی از مارکرهای مولکولی رایج می‌باشد که از آن برای مطالعه فیلوژنتیک آنوفل‌های ایران استفاده شده است [۳۰]. باید عنوان نمود که از این مارکر مولکولی برای شناسایی اعضای این دو گونه بهره گرفته شده است [۳۲،۳۱،۱۱].

آنالیز مولکولی توالی *ITS2* در *An. gambiae* s.s در غرب آفریقا جهت بررسی فرم‌های کروموزومی S و M در دو منطقه ساوانا و باماکو نشان داد که *An. gambiae* یک گونه ساده نمی‌باشد [۳۳]. آنالیز *ITS2* و RAPD در جمعیت *An. stephensi* در ایران نیز گویای آن بود که این گونه در ایران می‌تواند یک گونه با فرم‌های بیولوژیکی و اکولوژیکی مختلف در مناطق زئوجغرافیایی متفاوت باشد [۳۴]. در این مطالعه درخت فیلوژنی رسم‌شده از توالی‌های *An. gambiae* و *An. stephensi* بر پایه مارکر *ITS2* نشان داد که این مارکر می‌تواند کمپلکس *An. gambiae* را به‌صورت جداگانه دسته‌بندی نموده و گونه‌هایی مانند *An. arabiensis* و *An. bwambae* را در شاخه‌ای جدا از *An. gambiae* قرار دهد؛ اما فرم‌های بیولوژیک *An. stephensi* از یکدیگر تفکیک نمی‌گردند.

از سوی دیگر، شناسایی دو فرم بیولوژیکی *An. stephensi* *mysorensis* و *An. stephensi* type جمع‌آوری‌شده از مناطق مختلف شبه قاره هند با استفاده از دو مارکر *ITS2* و *D3* نشان از آن داشت که این توالی‌ها در تمامی نمونه‌های مورد مطالعه یکسان بوده و این مارکرها قادر به جداسازی این دو فرم نمی‌باشند [۳۵]. علاوه‌براین، استفاده از توالی‌های نواحی *COI*، *ITS2* و *D3* در *An. funestus*، *An. gambiae* و *An. rivulorum* نشان داد که در توالی‌های *COI*، گونه‌های کمپلکس *An. gambiae* s.l به‌صورت یکسان طبقه‌بندی شده‌اند؛ درحالی که در توالی‌های *ITS2*، تفاوت‌هایی در طبقه‌بندی مشاهده می‌گردد [۳۶]. در این راستا، آنالیز توالی‌های *COI* و *An. stephensi COII* در ایران نشان‌دهنده آن بود که به‌غیر از تعداد کمی جایگزینی در توالی‌های *COII*، تمامی فرم‌های بیولوژیکی و جمعیت‌ها بسیار نزدیک به یکدیگر بوده و این توالی‌ها در جمعیت‌های مختلف این گونه بسیار شبیه به یکدیگر می‌باشند [۳۷]. در این ارتباط در بررسی مولکولی *COI* بر روی *An. stephensi* در کشور پاکستان، هیچ‌گونه اختلاف

[Downloaded from jhc.mazums.ac.ir on 2025-12-08]

[DOR: 20.1001.1.24236772.1397.4.3.5.4]

ژنتیکی بین جمعیت‌ها مشاهده نشد [۳۸]. درخت فیلوژنی که با استفاده از توالی *D3* در *An. gambiae* و *An. stephensi* در این مطالعه رسم گردید، نشان داد که این مارکر می‌تواند دو گونه را به‌خوبی از یکدیگر مجزا کند و در دو شاخه جداگانه قرار دهد؛ اما نمی‌تواند اعضای درون گونه را مجزا نماید.

اخیراً از توالی ناحیه اینترون OBP۱ در *An. stephensi* به‌عنوان مارکر مولکولی برای شناسایی و تفکیک فرم‌های بیولوژیک این گونه استفاده شده است [۳۹]. درخت فیلوژنی براساس توالی این مارکر نشان داد که علاوه بر جداسازی دو گونه، تفاوت‌های درون گونه‌ای *An. stephensi* در سه گروه مجزا جای گرفته‌اند؛ اما به دلیل اینکه تنها یک توالی از *An. gambiae* در بانک جهانی ژن موجود بود، نمی‌توان در مورد کارایی آن در اعضای کمپلکس *An. gambiae* اظهار نظر نمود.

به نظر می‌رسد که استفاده تلفیقی از روش‌های مختلف تشخیصی (چه به‌صورت سنتی و چه با استفاده از روش‌های مولکولی و مارکرهای جدید) می‌تواند در تفکیک بین گونه‌ای مورد استفاده قرار گیرد. در تفکیک گونه‌های آنوفل، استفاده از مارکرهای هسته‌ای مانند *ITS2* و *D3* به دلیل داشتن نواحی کمتر تغییرپذیر در طولانی مدت می‌تواند برای تفکیک بین دو گونه مناسب باشد؛ اما در مطالعات ژنتیک، جمعیت داخل گونه‌ای مارکرهای مولکولی مانند *COII*، *COI* و *OBP1* کارایی بهتری دارند؛ از این رو در راستای برنامه حذف مالاریا در ایران و کشورهای تحت پوشش دفتر منطقه‌ای مدیترانه شرقی سازمان جهانی بهداشت، استفاده از روش‌های جدید آنالیز مولکولی توصیه می‌گردد تا با تلفیق داده‌های مورفولوژیکی، مولکولی و اپیدمیولوژی میدانی بتوان راه‌کارهایی عملی برای برنامه‌های کنترل ناقلین را ارائه داد. بدیهی است که هیچ‌یک از این داده‌ها به‌تنهایی پاسخگوی نیازهای برنامه کنترل ناقلین نبوده و هماهنگی طراحی، اجرا و ارزیابی طرح‌های تحقیقاتی کاربردی و اقدامات اجرایی، لازمه موفقیت حذف و ریشه‌کنی مالاریا و دیگر بیماری‌های ناقل‌زاد می‌باشد.

قدردانی

بدین‌وسیله نویسندگان این مقاله از حمایت‌های مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه (طرح شماره ۲۴۴۰) و انستیتو پاستور ایران قدردانی می‌نمایند.

References

1. Vernick KD, Waters AP. Genomics and malaria control. N Engl J Med 2004; 351(18):1901-4.
2. Who/Unicef Report: malaria mdg target achieved amid sharp drop in cases and mortality, but 3 billion people remain at risk. Neurosciences 2016; 21(1):87-8.
3. Barber BE, Rajahram GS, Grigg MJ, William T, Anstey NM. World Malaria report: time to acknowledge *Plasmodium knowlesi* malaria. Malar J 2017; 16(1):135.
4. Miller J, Broad WJ, Engelberg S. Germs: biological weapons and America's secret war. New York: Simon and Schuster; 2012.
5. Ockenhouse CF, Sun PF, Lanar DE, Wellde BT, Hall BT, Kester K, et al. Phase I/IIa safety, immunogenicity, and efficacy trial of NYVAC-Pf7, a pox-vectored, multiantigen, multistage vaccine candidate for Plasmodium falciparum malaria. J Infect Dis 1998; 177(6):1664-73.
6. Harbach RE, Kitching IJ. The phylogeny of *Anophelinae* revisited: inferences about the origin and classification of Anopheles (Diptera: Culicidae).

[Downloaded from jhc.mazums.ac.ir on 2025-12-08]

[DOR: 20.1001.1.24236772.1397.4.3.5.4]

Zoologica Scripta 2016; 45(1):34-47.
7. Service M, Townson H. The *Anopheles* vector. London, UK: Dragana Manestar; 2002. P. 59-84.
8. Salem OA, Khadijetou ML, Moina MH, Lassana K, Sébastien B, Ousmane F, et al. Characterization of *anopheline* (Diptera: Culicidae) larval habitats in Nouakchott, Mauritania. J Vector Borne Dis 2013; 50(4):302-6.
9. Gilles M, De Meillon B. The *Anophelinae* of Africa, south of Sahara (Ethiopian Zoogrographical Region) Johannesburg. South African: Publications of the South African Institute of Medical Research; 1968.
10. Coetzee M, Craig M, Le Sueur D. Distribution of African malaria mosquitoes belonging to the *Anopheles gambiae* complex. Parasitol Today. 2000; 16(2):74-7.
11. Santolamazza F, Della Torre A, Caccone A. A new polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method to identify *Anopheles arabiensis* from *An. gambiae* and its two molecular forms from degraded DNA templates or museum samples. Am J Trop Med Hyg 2004; 70(6):604-6.
12. Scott JA, Brogdon WG, Collins FH. Identification of single specimens of the Anopheles gambiae complex by the polymerase chain reaction. Am J Trop Med Hyg 1993; 49(4):520-9.
13. White GB. Notes on a catalogue of Culicidae of the Ethiopian region. Mosquito Syst 1975; 7:303-44.
14. Kiszewski A, Mellinger A, Spielman A, Malaney P, Sachs SE, Sachs J. A global index representing the stability of malaria transmission. Am J Trop Med Hyg 2004; 70(5):486-98.
15. Mastbaum O. Past and present position of malaria in Swaziland. Am J Trop Med Hyg 1957; 60(5):119-27.
16. Ribbands CR. Differences between Anopheles melas (A. gambiae var. melas) and Anopheles gambiae. I.- The larval Pecten. Ann Trop Med Parasitol 1944; 38(2):85-6.
17. Bruce-Chwatt LJ. Essential malariology. New Hampshire, USA: William Heinemann Medical Books Ltd; 1985.
18. Krishnan K. *Anopheles stephensi* Liston, 1901. India: Vectors of Malaria in India; 1961.
19. Manouchehri A, Javadian E, Eshighy N, Motabar M. Ecology of Anopheles stephensi Liston in southern Iran. Trop Geogr Med 1976; 28(3):228-32.
20. Morgan K, O'Loughlin SM, Mun-Yik F, Linton YM, Somboon P, Min S, et al. Molecular phylogenetics and biogeography of the neocellia series of anopheles mosquitoes in the oriental region. Mol Phylogenet Evol 2009; 52(3):588-601.
21. World Health Organization. Resistance of vectors of disease to pesticides. Fifth report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control. Resistance of vectors of disease to pesticides Fifth report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control. Geneva: World Health Organization; 1980.
22. Sinka ME, Bangs MJ, Manguin S, Coetzee M, Mbogo CM, Hemingway J, et al. The dominant Anopheles vectors of human malaria in Africa, Europe and the Middle East: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. Parasit Vectors 2010; 3(1):117.
23. Gakhar SK, Sharma R, Sharma A. Population genetic structure of malaria vector Anopheles stephensi Liston (Diptera: Culicidae). India: National Institute of Science Communication and Information Resources; 2013.
24. World Health Organization. Anopheline species complexes in south-east Asia: WHO Regional Offices for South-East Asia New Delhi. Geneva: World Health Organization;1998.
25. Sweet W, Rao BA. Races of *A. stephensi* Liston, 1901. Indian Med Gazette 1937; 72(11):665.
26. Rao TR. The Anophelines of India, Rev. Edn. Delhi: Malaria Research Centre (ICMR); 1984. P. 154-8.
27. Rutledge LC, Ward RA, Bickley WE. Experimental hybridization of geographic strains of *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). Ann Entomol Soc Am 1970; 63(4):1024-30.
28. Subbarao SK, Vasantha K, Adak T, Sharma V, Curtis C. Egg-float ridge number in *Anopheles stephensi*: ecological variation and genetic analysis. Med Vet Entomol 1987; 1(3):265-71.
29. Holstein MH. Biology of Anopheles gambiae research in French West Africa. Geneva: World Health Organization; 1954.
30. Gholizadeh S, Djadid ND, Nouroozi B, Bekmohammadi M. Molecular phylogenetic analysis of *Anopheles* and *Cellia* subgenus *anophelines* (Diptera: Culicidae) in temperate and tropical regions of Iran. Acta Trop 2013; 126(1):63-74.
31. Djadid ND, Gholizadeh S, Aghajari M, Zehi AH, Raeisi A, Zakeri S. Genetic analysis of rDNA-ITS2 and RAPD loci in field populations of the malaria vector, Anopheles stephensi (Diptera: Culicidae): implications for the control program in Iran. Acta Trop 2006; 97(1):65-74.
32. Gentile G, Slotman M, Ketmaier V, Powell JR, Caccone A. Attempts to molecularly distinguish

[Downloaded from jhc.mazums.ac.ir on 2025-12-08]

[DOR: 20.1001.1.24236772.1397.4.3.5.4]

cryptic taxa in *Anopheles gambiae* ss. Insect Mol Biol 2001; 10(1):25-32.
33. Gentile G, Slotman M, Ketmaier V, Powell JR, Caccone A. Attempts to molecularly distinguish cryptic taxa in *Anopheles gambiae* s.s. Insect Mol Biol 2001; 10(1):25-32.
34. Djadid ND, Gholizadeh S, Aghajari M, Zehi AH, Raeisi A, Zakeri S. Genetic analysis of rDNA-ITS2 and RAPD loci in field populations of the malaria vector, *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae): implications for the control program in Iran. Acta Trop 2006; 97(1):65-74.
35. Alam MT, Bora H, Das MK, Sharma YD. The type and mysorensis forms of the *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae) in India exhibit identical ribosomal DNA ITS2 and domain-3 sequences. Parasitol Res 2008; 103(1):75-80.
36. Norris LC, Norris DE. Phylogeny of *anopheline* (Diptera: Culicidae) species in southern Africa, based on nuclear and mitochondrial genes. J Vector Ecol 2015; 40(1):16-27.
37. Oshaghi M, Yaghoobi F, Vatandoost H, Abai M, Akbarzadeh KJ. *Anopheles stephensi* biological forms, geographical distribution, and malaria transmission in malarious regions in Iran. Pak J Bio Sci 2006; 9(2):294-8.
38. Ali N, Hume JC, Dadzie SK, Donnelly MJ. Molecular genetic studies of *Anopheles stephensi* in Pakistan. Med Vet Entomol 2007; 21(3):265-9.
39. Gholizadeh S, Firooziyan S, Ladonni H, Hajipirloo HM, Djadid ND, Hosseini A, et al. The *Anopheles stephensi* odorant binding protein 1 (AsteObp1) gene: a new molecular marker for biological forms diagnosis. Acta Trop 2015; 146:101-13.

[Downloaded from jhc.mazums.ac.ir on 2025-12-08]

[DOR: 20.1001.1.24236772.1397.4.3.5.4]